

51457-2000600-10361

DELPHION

Log Out Work Files Saved Searches

RESEARCH My Account

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

Select ER

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [More choices...](#)

Tools: Add to Work File:

View: Jump to: Go to: [Derwent](#) ☒ Email this to a friend

Title: CN1375507A: SURFACE CLADDING AND RADICAL FUNCTIONAL MODIFICATION METHOD OF MAGNETIC MICROSPHERE, THUS OBTAINED MICROSPHERE AND ITS APPLICATION

Derwent Title: Production of coated magnetizable microparticles used for manipulating e.g. proteins and nucleic acids in sample, involves cross-linking polymers on a microparticle and linking functionalized agent to polymers [\[Derwent Record\]](#)

Country: CN China

Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection

Inventor: DEPU CHEN; China

XIN XIE; China

XU ZHANG; China

Assignee: TSINGHUA UNIV. China

[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 2002-10-23 / 2001-03-20

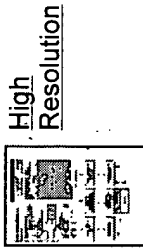
Application Number: CN2001000109870

IPC Code: C08F 2/44; A61K 51/02; G01N 33/553

ECLA Code: None

Priority Number: 2001-03-20 CN2001000109870

Abstract: The present invention adopts one-step suspension polymerization method to cover and group-functionally modify the magnetic microspheres whose grain size is in the range of 5-1000 nm, so that the grain size of magnetic microspheres made up by using said invented method is 10 nm-2 micrometers. Said invented magnetic microspheres can be used in the purification,



concentration, separation and detection of biological material, and can be used as carrier for directional controlling biological molecule in microarray electromagnetic unit biological chip.

INPADOC
Legal Status:
Designated
Country:

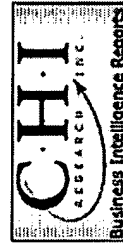
None Get Now: [Family Legal Status Report](#)

AE AG AL AM AP AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EA EC
EE EP ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL

Family:

| PDF | Publication | Pub. Date | Filed | Title |
|------------------------------|---------------------------------|------------|------------|---|
| | WO02075309A1 | 2002-09-26 | 2002-03-20 | PROCESSES FOR PRODUCING COATED MAGNETIC MICROPARTICLES AND USES THEREOF |
| | US20050009002A1 | 2005-01-13 | 2004-09-03 | Processes for producing coated magnetic microparticles and uses thereof |
| | JP2004528550T2 | 2004-09-16 | 2002-03-20 | |
| | EP1381861A1 | 2004-01-21 | 2002-03-20 | PROCESSES FOR PRODUCING COATED MAGNETIC MICROPARTICLES AND USES THEREOF |
| | CN1375507A | 2002-10-23 | 2001-03-20 | SURFACE CLADDING AND RADICAL FUNCTINO MODIFICATION METHOD OF MAGNETIC MICROSPHERE, THUS OBTAINED MICROSPHERE AND ITS APPLICATION |
| | CN1152055C | 2004-06-02 | 2001-03-20 | Surface cladding and radical function modification method of magnetic microsphere, microsphere obtained and application of the same |
| 6 family members shown above | | | | |

Other Abstract
Info:



Nominate this for the Gallery...

THOMSON

Subscriptions | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C08F 2/44

A61K 51/02 G01N 33/553

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01109870.8

[43] 公开日 2002 年 10 月 23 日

[11] 公开号 CN 1375507A

[22] 申请日 2001.3.20 [21] 申请号 01109870.8

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

[72] 发明人 陈德朴 谢欣 张旭 孙宝全

费维扬 周玉祥 程京

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 磁性微球的表面包覆和基团功能化修饰
方法及所得微球及其应用

[57] 摘要

本发明涉及对单分散磁性微球表面进行聚合物包覆及基团功能化修饰的新方法,由此方法制得的磁性微球及其应用。本发明方法可通过一步悬浮聚合法包覆并功能化修饰粒径在 5-1000nm 范围内的磁球,如此制得的磁性微球的粒度在 10nm-2 μ m。本发明的磁性微球可应用在生物材料的提纯、浓缩、分离、检测中,以及作为在微阵列电磁单元生物芯片中对生物分子定向控制的载体。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1、一种磁性微球表面包覆及功能化的方法，该方法包括如下步骤：

- (1) 将粒径范围在 5—1000nm 的某一粒径的单分散的磁性微球在强烈超声及搅拌下，分散于含有表面活性剂的有机溶剂介质中；
- (2) 向上述含分散有磁性微球的有机溶剂中加入包覆单体、功能化试剂、引发剂、偶联剂和交联剂；
- (3) 反应开始时先强烈搅拌 30 分钟，促使单体充分分散并分配于磁性微球表面，之后通氮气除氧，降低搅拌速度至 30rpm，升温至 80℃恒温，在氮气气氛下反应 12 小时；
- (4) 待聚合反应结束后，将反应物在磁搅拌器上搅拌，待磁性树脂沉积后，倾去上层清液；
- (5) 将磁性树脂真空抽滤，用去离子水、无水乙醇和丙酮多次洗涤，得到带功能基团的表面包覆聚合物的磁性微球。

2、权利要求 1 所述的方法，其中包括包覆单体、功能化试剂、偶联剂和交联剂的总和的总有机单体与磁性微球的质量比为 1: 400~1: 1。

3、权利要求 2 所述的方法，其中各种组分在总有机单体中的含量为：偶联剂为 1~10% (体积)；包覆单体为 0~80% (体积)；交联剂为 10~80% (体积)；功能化试剂为 5~40% (体积)；引发剂为 1~5% (重量)。

4、如权利要求 1 所述的方法，其中表面活性剂在有机溶剂中的体积分数为 0.1~5%。

5、如权利要求 1 所述的方法，其中包覆单体选自丙烯酸，甲基丙烯酸，甲基丙烯酸甲酯，甲基丙烯酸-2-羟乙酯，乙二醇单（含或不含甲基）丙烯酸酯，二乙二醇单（含或不含甲基）丙烯酸酯，

三乙二醇（含或不含甲基）丙烯酸酯，乙二醇二环氧单（含或不含甲基）丙烯酸酯，三羟甲基丙烷单（含或不含甲基）丙烯酸酯，季戊四醇单（含或不含甲基）丙烯酸酯，苯乙烯及其混合物。

6、如权利要求 1 所述的方法，其中交联剂选自乙二醇双（含或不含甲基）丙烯酸酯，二乙二醇双（含或不含甲基）丙烯酸酯，三乙二醇双（含或不含甲基）丙烯酸酯，乙二醇双环氧双（含或不含甲基）丙烯酸酯，三羟甲基丙烷三（含或不含甲基）丙烯酸酯，季戊四醇二（含或不含甲基）丙烯酸酯，二乙烯苯。

7、如权利要求 1 所述的方法，其中有机溶剂选自甲苯，二甲苯，四氢呋喃，乙醇和水的体系。

8、如权利要求 1 所述的方法，其中引发剂选自过氧化苯甲酰（BPO）、偶氮二异丁腈。

9、如权利要求 1 所述的方法，其中表面活性剂为选自烷基酚聚氧乙烯醚，十二烷基硫酸钠，十二烷基苯磺酸钠的非离子表面活性剂或阴离子表面活性剂。

10、如权利要求 1 所述的方法，其中功能化试剂选自丙烯酸，甲基丙烯酸，乙二醇双环氧单丙烯酸酯，丙烯酸-2-羟乙酯，季戊四醇二丙烯酸酯和甲基丙烯醛。

11、如权利要求 1 所述的方法，其中偶联剂选自磷酸双-（甲基丙烯酸-2-羟乙酯），磷酸双-（三羟甲基丙烷二丙烯酸酯）和磷酸双-（季戊四醇三丙烯酸酯）。

12、由前述任一项权利要求的方法制得的表面包覆并功能化修饰的磁性微球。

13、权利要求 12 所述的磁性微球，其粒度为 10nm-2 μ m。

14、权利要求 12 所述的磁性微球，其核心为铁氧化物。

15、权利要求 12 所述的磁性微球在生物物质分离中的应用。

16、权利要求 12 所述的磁性微球作为电磁定向控制的生物大

分子载体的应用。

17、权利要求 12 所述的磁性微球作为生物分子磁标记的磁性微球探针的应用。



说明书

磁性微球的表面包覆和基团功能化修饰方法 及所得微球及其应用

本发明涉及对单分散磁性微球表面进行聚合物包覆及基团功能化修饰的方法，由此方法制得的磁性微球及其应用。本发明方法可通过一步悬浮聚合法包覆及功能化修饰粒径在 5—1000nm 范围内的磁球，如此制得的微球的粒度在 10nm-2 μ m。本发明的磁性微球可应用在生物材料的提纯、浓缩、分离、检测中，以及作为在微阵列电磁单元生物芯片中对生物分子定向控制的载体。

从样液中分离、提纯与检测各种蛋白质（各种抗体、抗原、酶）、核酸 DNA、RNA 和细胞等，是生命科学以及临床医学中一个重要的环节。实际样品的分离、纯化在试验的时间和经费上都占相当大的比重，有时甚至可达到 90%以上。目前常用的分离方法有沉淀法，离心法，离子交换法，各种色谱法等。但有些方法需要比较昂贵的仪器设备，有些方法尽管简单易操作，分离效果差，有些方法操作复杂和费时，使它们的应用程度受到了很大的限制。现代对样品制备的要求能实现自动化小型化；不使用或尽量少使用有毒试剂；快速、高效；产物适于后续生物化学操作；成本较低。

在最近十几年磁性颗粒被用于生物材料分离，提纯，浓缩。磁性微球作为新型功能高分子材料，在生物医学（临床诊断，免疫分析，酶标，靶向药物），细胞学（细胞标记，细胞分离），分子生物学（cDNA 文库，基因测序，DNA，mRNA 的提取与杂交）及生物工程（酶的固定化），新兴的生物芯片技术等领域将有广泛的应用前景。相对于上述传统的生物分子分离方法，采用磁性微球分离技术不需要大型贵重仪器，实验方法简单快捷，实验设备简单，而且提取效率高，分离过程比各种色谱方法要快速简单得多。目前国内外，磁球在生

物方面的应用相对比较成熟的是在微米粒径的生物磁球，微米级的磁粒主要集中在细胞分离。如含有抗生素蛋白，植物凝集素等配体结合的磁性微球可用于骨髓中 T 细胞的分离；纳米磁性微球用于生物分子的标记研究的还比较少，而纳米磁性微球的包覆和表面功能化则更鲜见于文献。纳米磁性微球分离技术是一种很好的分离手段，有广阔的应用前景。更由于其具有的软磁性材料性质，可用于靶向药物，通过外磁场的作用到达病变部位，通过磁球上携带的药物达到治疗的作用。

带功能基团的表面包覆聚合物的磁性微球由内部磁性核心和表面聚合物包覆层组成。目前的制备方法有多种，其中一种方法是先制备磁性氧化铁核，再经表面包覆方法制备。但由于磁性氧化铁 (Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) 内核极性太强而聚合物包覆层极性低，在磁性微球表面包覆聚合物层较困难；包覆过程中单体可能自身发生聚合反应，而未在磁球表面聚合包覆。也可能在包覆过程中发生纳米颗粒的团聚。目前磁性微球包覆的方法可分为物理方法和化学方法。物理方法主要是包埋法，是将磁性微粒分散于高分子溶液中，通过雾化，絮凝，沉积，蒸发等手段除去溶剂，得到磁性高分子微球。包埋法得到的磁性微球其磁性粒子（磁核）与外层的结合力弱，主要是范德华力（包括氢键），易于脱落。所得的粒子粒径分布宽，形状不规则，粒径不易控制。如直接将磁粒分散在的氨基葡聚糖 (Aminodextran) 或聚甲基丙烯酸，或卵磷脂的水溶液中，通过物理吸附使颗粒的表面包被上一层聚合物膜。由于容易发生颗粒团聚，该法无法用于小于 10 纳米的磁性微球的包覆。化学方法进行包覆主要有悬浮聚合法。包覆是以磁性微球为核心，单体在磁性微球表面发生聚合反应。为使聚合反应在磁性微球表面进行，目前主要采用对微球表面进行硅烷化的方法，但该包覆过程需分步进行，操作复杂；且在处理过程中要产生 HCl 气体，对微球产生腐蚀作用。由于纳米粒子粒径小而

表面能高，易被腐蚀而破坏表面，或改变粒径，表面硅烷化方法难以应用于纳米粒子的包覆。

因此，本发明的一个目的是克服现有技术中的不足，提供一种新的包覆和基团功能化修饰磁性微球的方法。

本发明的再一目的在于提供由本发明方法获得的表面包覆和基团功能化修饰的磁性微球。

本发明的又一目的在于提供所得磁性微球在生物材料的提纯、浓缩、分离、检测中的应用，以及作为在微阵列电磁单元生物芯片中对生物分子定向控制的载体的应用。

根据本发明的一个方面，本发明涉及一种一步法实现纳米或微米磁性微球表面包覆及功能化的方法，该方法中表面包覆及功能化采用悬浮聚合法，该方法包括如下步骤：

(1) 将粒径范围在 5—1000nm 的某一粒径的单分散的磁性微球在强烈超声及搅拌下，分散于含有表面活性剂的有机溶剂介质中；

(2) 向上述含分散有磁性微球的有机溶剂中加入包覆单体、功能化试剂、引发剂、偶联剂和交联剂；

(3) 反应开始时先强烈搅拌 30 分钟，促使单体充分分散并分配于磁性微球表面，之后通氮气除氧，降低搅拌速度至 30rpm，升温至 80℃ 恒温，在氮气气氛下反应 12 小时；

(4) 待聚合反应结束后，将反应物在磁搅拌器上搅拌，待磁性树脂沉积后，倾去上层清液；

(5) 将磁性树脂真空抽滤，用去离子水、无水乙醇和丙酮多次洗涤，得到带功能基团的表面包覆聚合物的磁性微球。

本发明方法中，聚合时各种试剂的用量可视使用要求而改变。参与聚合反应的总有机单体（包括包覆单体、功能化试剂、偶联剂和交联剂的总和）与磁性微粒的质量比为 1：400 ~ 1：1 的范围内。

各种组分在总有机单体中的含量为：偶联剂为 1~10%（体积）；包覆单体为 0~80%（体积）；交联剂为 10~80%（体积）；功能化试剂为 5~40%（体积）；引发剂为 1~5%（重量）。另外，表面活性剂在有机溶剂中的体积分数为 0.1~5%。

本发明方法中适合形成聚合物包覆层的包覆单体包括但不限于：丙烯酸，甲基丙烯酸，甲基丙烯酸甲酯，甲基丙烯酸-2-羟乙酯，乙二醇单（含或不含甲基）丙烯酸酯，二乙二醇单（含或不含甲基）丙烯酸酯，三乙二醇（含或不含甲基）丙烯酸酯，乙二醇二环氧单（含或不含甲基）丙烯酸酯，三羟甲基丙烷单（含或不含甲基）丙烯酸酯，季戊四醇单（含或不含甲基）丙烯酸酯，苯乙烯等。这些单体可以单独使用，也可以混合使用，最好与交联剂配合使用。

本发明方法中适合形成聚合物包覆层的交联剂包括但不限于：乙二醇双（含或不含甲基）丙烯酸酯，二乙二醇双（含或不含甲基）丙烯酸酯，三乙二醇双（含或不含甲基）丙烯酸酯，乙二醇双环氧双（含或不含甲基）丙烯酸酯，三羟甲基丙烷三（含或不含甲基）丙烯酸酯，季戊四醇二（含或不含甲基）丙烯酸酯，二乙烯苯。这些交联剂与单体配合使用，可取得很好的包覆效果。

本发明方法中有机溶剂可选用甲苯，二甲苯，四氢呋喃，乙醇和水的体系等。

本发明方法中，聚合时引发剂可选用过氧化苯甲酰（BPO）、偶氮二异丁腈等。

本发明方法中为使磁性微球在有机溶剂中充分分散，选用非离子表面活性剂或阴离子表面活性剂，例如但不限于烷基酚聚氧乙烯醚(OP-10, OP-15)，十二烷基硫酸钠，十二烷基苯磺酸钠等。在反应开始前须对体系强烈搅拌并用超声进行分散，以免纳米颗粒在聚合过程中发生团聚。但聚合开始后，应降低搅拌速度，以减少颗粒相互碰撞的机会。

为使包覆后的纳米或微米磁性微球与生物分子有效地连接，微球表面需经功能化，使不同的功能化基团连接于微球的表面，这些功能化基团可选择氨基，羧基，羟基，醛基和环氧基，以及巯基等。通过这些功能化基团，磁性微球可与生物分子通过一定条件下的反应相连，这种连接方式是共价键连接，比较稳固，不易断裂。本发明方法中，选用既含有功能化基团，又含有双键的单体作为功能化试剂，在包覆过程中加入了带有功能化基团的单体，聚合完成后，包覆和功能化过程同时完成。

本发明中用的功能化试剂为带有功能化基团的单体，例如但不限于：丙烯酸，甲基丙烯酸，乙二醇双环氧单丙烯酸酯，丙烯酸-2-羟乙酯，季戊四醇二丙烯酸酯，甲基丙烯醛等。

因为磁性纳米粒子的表面极性较强，而聚合物的极性较弱，为使聚合物完全包覆于微粒表面，本发明方法的一个关键特征是加入偶联剂，本发明方法所用的偶联剂选自磷酸双-(甲基丙烯酸-2-羟乙酯)，磷酸双-(三羟甲基丙烷二丙烯酸酯)，磷酸双-(季戊四醇三丙烯酸酯)等。这些偶联剂的共同特点是一端含有强极性的磷酰氧键，与无机物（铁的氧化物）具有强的络合作用，而另一端是与其它单体亲和力强的侧链、并含可与之共聚的双键。这样，单体可完全吸附于微粒表面再发生聚合，并通过交联剂使其形成空间网状结构，结果可以在纳米磁球表面形成分布均匀的聚合物包覆层，而纯单体基本上不形成新的聚合物颗粒。这样，包覆与功能化反应就可以简单地一次完成。

根据本发明的另一方面，本发明涉及根据本发明方法制备的磁性微球。本发明制得的带功能基团的表面包覆聚合物的纳米或微米磁性微球为无机物和有机物关联的高分子复合材料，由金属氧化物（如铁，钴，镍等氧化物，在生物应用中性能最好的是 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ）组成核，高分子或生物高分子材料组成包覆层，外表层含有

事先设定的功能化基团。包覆及修饰过程不应导致磁响应特性的显著下降。该纳米磁性微球为软磁性，即磁粒只有在外磁场作用下才表现出强的磁性，而当外磁场撤去后，则不再有磁性，其饱和磁化强度高，剩磁和矫顽力小。一般近似球形，粒度大小可根据需要的不同在 $10\text{nm}-2\mu\text{m}$ 范围内选择，制得的纳米或微米磁性微球粒径比较均匀，粒度分布范围比较窄，在 $\pm 10\%$ 之内。纳米磁性微球可较好地分散于水溶液中，不易沉淀与相互絮凝，可耐受生物样品环境的侵蚀，使用寿命长。

带功能基团的表面包覆聚合物的磁性微球包覆层的厚度可以根据要求进行调节。包覆是以纳米或微米磁性微球为核心，发生单体的聚合和交联反应。参与聚合反应的有机单体（这里参与聚合反应的有机单体包括前述的包覆单体、功能化试剂、偶联剂和交联剂的总和）的量不同时，包覆在磁性微球表面的聚合物的量是不同的，这样得到的包覆磁性微球的粒径和平均密度不同，因此通过控制加入包覆有机物的量，达到控制粒径和平均密度的目的。对 $5-1000\text{nm}$ 的纳米磁性微晶，通过改变单体的量，可制备 $10\text{nm}-2\mu\text{m}$ 范围内的任一粒径的包覆磁性微球。

本发明中优选由 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 组成核进行包覆，由于 Fe_3O_4 和 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的密度比较大，都大于 4kg/m^3 ，为使纳米或微米磁性微球长时间悬浮在溶液中，同时磁性微球不被所使用的溶液腐蚀或溶解，用有机聚合物包覆，其平均密度可减小，再加上双电层效应，应用胶体的一些特性，可使磁性微球在溶液中长时间悬浮。

根据本发明的又一方面，本发明涉及所得磁性微球在生物材料的提纯、浓缩、分离、检测中的应用，以及作为在微阵列电磁单元生物芯片中对生物分子定向控制的载体的应用。

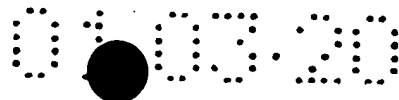
具体地，根据本发明方法获得的表面包覆及功能化修饰的磁性微球可作为生物物质分离，电磁定向控制的载体和生物分子磁标记

磁性微球探针，可用来对生物分子如 DNA、RNA、多肽、蛋白质(酶、抗体、抗原等)、细胞等进行标记。该磁性微球探针可广泛用于生命科学研究中的多种生物分子的标记，提纯，浓缩和分离，如临床诊断中的免疫分析，cDNA 文库的创建，以及在微阵列电磁单元生物芯片中作为生物分子定向控制的载体。对生物分子如 DNA，蛋白质进行磁修饰后，使在电磁生物芯片上可通过单点选通的磁极对磁修饰的生物分子进行定向控制，使其定向移动，实现微量反应物浓缩，富集和检测的目的，为建立芯片实验室提供条件。

本发明制备的带功能基团的表面包覆聚合物的磁性微球探针与生物分子连接的方法可分为直接法和间接法。磁性微球在使用前需进行灭菌处理，在 4℃，pH4-10，不冷冻时可稳定长期保存。

直接法是将磁性微球探针分散在磷酸盐溶液中，加入待标记的生物分子(如 DNA，多肽，蛋白质等)，当功能化基团为环氧基时，与生物分子连接时反应溶液应控制在碱性；当功能化基团为羧基时，加入活化试剂 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳二亚胺；醛基与生物分子连接时，反应后生成的西夫碱不够稳定，需加入硼氰化钠反应生成稳定的仲胺；氨基与生物分子连接时，先加入戊二醛使氨基转变成醛基，再与生物分子连接。所有反应缓慢搅拌数小时，用磁性分离架将纳米或微米磁球固定，用磷酸盐缓冲溶液 (PBS-T, PBS 中含 0.05% Tween20) 洗涤三次，得到纳米或微米磁性微球探针标记的生物分子。这些标记的生物分子，可用于和其具有特异反应的生物分子结合，从而进行生物分子的分离，提取与检测。如将某种抗体固定在纳米或微米磁球的表面，该抗体可和与其具有特异反应的抗原结合。而从样品中将这种特异抗原分离出来。

间接法是采用例如生物素 (biotin) 和亲和素 (avidin) 或链亲和素 (streptavidin) 的特异亲和体系，利用生物大分子两者的高度特异亲和力，通过纳米或微米磁性微球表面的功能化基团将亲和素或链



酶菌亲和素包覆在纳米或微米磁性微球的表面，将靶生物分子在溶液中与生物素结合，成为生物素修饰的靶生物分子，依靠生物素—亲和素的结合反应，使靶生物分子得到高效快速的分离。通过外磁场在与母液分离后，可通过洗脱液将靶生物分子与生物素分离。该分离技术可用于多种生命科学研究，临床疾病检测，DNA 芯片，蛋白质芯片等研究领域。

本发明方法的优点是将粒径在 5—1000nm 范围内的任一粒径的单分散磁性微球在有机溶剂中用悬浮聚合法进行聚合物表面包覆，并在聚合过程中加入带功能基的单体，使表面连接功能化基团。这样可改变其密度和亲-疏水特性，保护表面不受环境侵蚀。包覆过程对磁性影响不大，不会形成新的聚合物核，也不会使纳米磁性微球发生团聚。通过控制包覆单体的量可制备粒径 10nm-2 μ m 范围内的任一粒径的表面基团功能化修饰的包覆磁性微球。磁球粒度分布窄，单分散性好，可较长时间悬浮在水溶液中。如将生物分子，如特异的抗体、抗原、DNA、RNA、蛋白质、酶或细胞等，通过功能化基团反应固定在该磁性微球的表面，偶联的生物分子仍然保持生物活性，可用作生物材料的提纯、浓缩、分离、检测，以及在微阵列电磁单元生物芯片中对生物分子定向控制的载体。

以下参照附图和实施例详细描述本发明，其中

图 1 为实施例 1 中包覆后的纳米磁性微球的磁滞回线。

图 2 为如实施例 1 所述包覆的纳米磁性微球的红外光谱图。

图 3 为应用实施例 1 所述的电磁生物芯片电磁单元通电对磁性微球吸引富集在显微镜下放大图。

图 4 为如应用实施例 3 所述不同条件下 DNA 提取液琼脂糖凝胶电泳图，图中各泳道的处理条件为：泳道 1: NaI 100 μ l+异丙醇 100 μ l; 泳道 2: NaI 50 μ l+异丙醇 150 μ l; 泳道 3: NaI 150 μ l+异丙醇 50 μ l; 泳道 4: NaI 100 μ l+乙醇 100 μ l; 泳道 5: NaCl 100 μ l+乙醇 100 μ l; 泳道

泳道 6: NaI +PEG 200 μ l; 泳道 7: NaI +PEG 100 μ l+乙醇 100 μ l; 泳道 8:NaCl 100 μ l+异丙醇 100 μ l; 泳道 9: NaI 100 μ l+甲醇 100 μ l; 泳道 10:NaI +脲 100 μ l+异丙醇 100 μ l; 泳道 11:SDS 100 μ l+乙醇 100 μ l; 泳道 12:SDS 100 μ l+甲醇 100 μ l; 泳道 13:NaI +脲 100 μ l+乙醇 100 μ l; 泳道 14:NaI+urea 100 μ l+甲醇 100 μ l; 泳道 M: λ DNA(HindIII单切)分标记。

图 5 为如应用实施例 4 所述用不同方法、不同磁性微球分离大肠杆菌基因组 DNA 提取液琼脂糖凝胶电泳图, 图中各泳道条件为: 泳道 1: 未包覆磁球; 泳道 2: 未包覆磁球; 泳道 3: 聚苯乙烯包覆磁球; 泳道 4: 甲基丙烯酸羟乙酯包覆磁球; 泳道 5: 氨基葡聚糖包覆磁球; 泳道 6: 甲基丙烯酸包覆磁球; 泳道 L: 苯酚-氯仿法提取的 DNA; 泳道 M: λ -DNA(HindIII单切)标记。

实施例 1

甲基丙烯酸羟乙酯对 10nm 的 Fe_3O_4 纳米磁性微球包覆及环氧功能化

于装有回流冷凝管、搅拌器、温度控制器的三口烧瓶中, 将 3.274g Fe_3O_4 纳米磁性微球加入 500ml 甲苯中, 再加入 0.816g 十二烷基苯磺酸钠, 超声分散 0.5 小时, 通过强烈搅拌使纳米磁性微球分散于甲苯中。然后将过氧化苯甲酰 0.242g, 甲基丙烯酸-2-羟乙酯 2.5ml、三乙二醇双丙烯酸酯 1.5ml、磷酸双-(甲基丙烯酸 2-羟乙酯) 0.6ml、乙二醇双环氧单丙烯酸酯 1.2ml 加入三口烧瓶中, 先用搅拌桨强烈搅拌 30 min, 并通氮气除氧, 降低搅拌速度至 30rpm。油浴升温至 80 $^{\circ}\text{C}$ 恒温, 氮气气氛下反应 12 小时。在聚合反应结束后, 将反应物转至烧杯。置磁搅拌器上搅拌, 待磁性树脂沉积后, 倾去上层清液。将磁性树脂进行真空抽滤洗涤, 用去离子水洗去剩余的十二烷基苯磺酸钠等, 再用丙酮洗去未反应的有机物及吸附在磁性树脂上的杂

质，洗涤完毕后将包覆纳米磁性微球分散到 10ml 磷酸缓冲溶液中，4℃ 保存。该磁球亲水性较好，能悬浮于水中，表面带有环氧基团。可直接与带氨基的生物分子连接（包覆后的纳米磁性微球的磁滞回线见图 1）。通过对包覆与未包覆纳米磁性微球的红外光谱图（附图 2）比较，除 3390cm^{-1} 的羟基特征吸收峰和 576cm^{-1} 的 Fe_3O_4 的特征吸收峰外，在包覆纳米磁性微球的红外谱图上还出现以下吸收峰： 2933cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 吸收峰； 1560cm^{-1} 为 $-\text{C}=\text{C}-$ 吸收峰； 2885cm^{-1} 为 $-\text{CH}-$ 吸收峰； 1255cm^{-1} 为环氧基团吸收峰； 1728cm^{-1} 为羰基吸收峰； 1057cm^{-1} 为 $-\text{P}=\text{O}$ 基团吸收峰。这些有机官能团的存在有力的证明了包覆及功能化的成功。

实施例 2

聚苯乙烯包覆 50nm 的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米磁性微球及表面羧基功能化

单体苯乙烯在聚合反应前先除其所含阻聚剂。取单体苯乙烯 5ml，用 $4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液反复洗涤除去其中的阻聚剂，再用去离子水洗到中性。采用与实施例 1 相同的包覆方法。50 纳米 2.974g $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 磁性微球加入 500ml 甲苯中，再加入十二烷基硫酸钠 0.813g，超声分散 0.5 小时。然后将过氧化苯甲酰 0.208g，磷酸双-(三羟甲基丙烷二丙烯酸酯)0.5ml，甲基丙烯酸 1.5ml，苯乙烯 5ml，二乙烯苯 3ml 加入三口烧瓶中，先用搅拌桨强烈搅拌 30 min，并通氮气除氧，降低搅拌速度至 30rpm。油浴升温至 80°C 恒温，氮气气氛下反应 12 小时。在聚合反应结束后，将反应物转至烧杯。置磁搅拌器上搅拌，待磁性树脂沉积后，倾去上层清液。将磁性树脂进行真空抽滤洗涤，用去离子水洗去残余的十二烷基硫酸钠等，再用乙醇洗去未反应的有机物及吸附在磁性树脂上的杂质，洗涤完毕后将包覆纳米磁性微球分散到 10ml 磷酸缓冲溶液中，4℃ 保存。该磁球亲水

性较好，能悬浮于水中，磁性微球表面带有羧基。

实施例 3

甲基丙烯酸甲酯对 200nm 的 Fe_3O_4 磁性微球包覆及醛基功能化

于装有回流冷凝管、搅拌器、温度控制器的三口烧瓶中，将 5.584g Fe_3O_4 磁性微球加入 500ml 中，再加入 0.614g 烷基酚聚氧乙烯醚(OP-10)，超声分散 0.5 小时，强烈搅拌使磁性微球分散于二甲苯中。然后将偶氮二异丁腈 0.235g，甲基丙烯酸甲酯 2.5ml，季戊四醇二甲基丙烯酸酯 2.0ml、磷酸双-(甲基丙烯酸 2-羟乙酯) 0.4ml、甲基丙烯酸 1.5ml 加入三口烧瓶中，先用搅拌桨强烈搅拌 30 min，并通氮气除氧，降低搅拌速度至 30rpm。油浴升温至 80℃恒温，氮气气氛下反应 12 小时。在聚合反应结束后，将反应物转至烧杯。置磁搅拌器上搅拌，待磁性树脂沉积后，倾去上层清液。将磁性树脂进行真空抽滤洗涤，用去离子水洗去剩余的烷基酚聚氧乙烯醚等，再用丙酮洗去未反应的有机物及吸附在磁性树脂上的杂质，洗涤完毕后包覆盖纳米磁性微球分散到 10ml 磷酸缓冲溶液中，4℃保存。磁性微球表面带有醛基。

实施例 4

甲基丙烯酸羟乙酯对 100nm 的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 磁性微球包覆及羟基功能化

于装有回流冷凝管、搅拌器、温度控制器的三口烧瓶中，将 2.934g Fe_3O_4 磁性微球加入 500ml 乙醇和水比例为 4:1 的介质中，再加入 0.593g 烷基酚聚氧乙烯醚，超声分散 0.5 小时，强烈搅拌使磁性微球分散于乙醇和水的混合溶液中。然后将过氧化苯甲酰 0.247g，甲基丙烯酸-2-羟乙酯 2.0ml、季戊四醇三丙烯酸酯 3.5ml、磷酸双-(季戊四醇三丙烯酸酯)0.5ml、加入三口烧瓶中，先用搅拌桨强烈搅拌 30

min, 并通氮气除氧, 降低搅拌速度至 30rpm。油浴升温至 76℃ 恒温, 氮气气氛下反应 12 小时。在聚合反应结束后, 将反应物转至烧杯。置磁搅拌器上搅拌, 待磁性树脂沉积后, 倾去上层清液。将磁性树脂进行真空抽滤洗涤, 用去离子水洗去剩余的烷基酚聚氧乙烯醚等, 再用乙醇洗去未反应的有机物及吸附在磁性树脂上的杂质, 洗涤完毕后将包覆磁性微球分散到 10ml 磷酸缓冲溶液中, 4℃ 保存。磁性微球表面带有羟基。

实施例 5

季戊四醇三甲基丙烯酸酯对 1000nm 的 Fe_3O_4 磁性微球包覆及环氧基功能化

于装有回流冷凝管、搅拌器、温度控制器的三口烧瓶中, 将 2.836g Fe_3O_4 磁性微球加入 500ml 甲苯中, 再加入 0.583g 十二烷基苯磺酸钠, 超声分散 0.5 小时, 强烈搅拌使磁性微球分散于甲苯中。然后将偶氮二异丁腈 0.227g, 季戊四醇三甲基丙烯酸酯 2.2ml、三羟甲基丙烷三丙烯酸酯 1.5ml、磷酸双-(甲基丙烯酸 2-羟乙酯) 0.4ml、乙二醇双环氧单丙烯酸酯 1.8ml 加入三口烧瓶中, 先用搅拌桨强烈搅拌 30 min, 并通氮气除氧, 降低搅拌速度至 30rpm。油浴升温至 80℃ 恒温, 氮气气氛下反应 12 小时。在聚合反应结束后, 将反应物转至烧杯。置磁搅拌器上搅拌, 待磁性树脂沉积后, 倾去上层清液。将磁性树脂进行真空抽滤洗涤, 用去离子水洗去剩余的十二烷基苯磺酸钠等, 再用丙酮洗去未反应的有机物及吸附在磁性树脂上的杂质, 洗涤完毕后将包覆纳米磁性微球分散到 10ml 磷酸缓冲溶液中, 4℃ 保存。磁性微球表面带有环氧基。

应用实施例 1

用于微阵列电磁单元生物芯片中对生物分子定向控制

将实施例 3 获得的磁性微球与被测 DNA 靶样连接。在主动式电

磁生物芯片中，通过选通微阵列中电磁单元，可使 DNA 靶样迅速聚集于被选通的单元，实现对 DNA 分子的定向控制。采用本发明人自行开发设计的微阵列电磁单元生物芯片，该生物芯片中心有 16 个可单點選通的电磁极，通过对每个磁极外加电流的有无，控制该磁极是否产生电磁场，在电磁生物芯片上用紫外胶作一个反应容器池，在反应池的下方是 16 个可单點選通的电磁极，当某个电磁极通电后，在其周围空间产生磁场，对溶液中悬浮的磁球产生引力，使磁球在被选通的单元富集，通过对各个磁极电流的通断，可实现对磁球的定向控制，同时也实现了对和磁球偶联固定的生物分子的定向控制。电磁生物芯片磁极对磁球的富集，在显微镜下观察效果很明显，磁球被吸附于通电磁极附近（见图 3）。

应用实施例 2

用于免疫检测和分析

免疫反应采用传统的夹心式反应。免疫分析实验步骤如下所示。

由于 eppendorf 管内表面也可以吸附少量的蛋白质，为防止蛋白质的损失，先用 1% 的牛血清蛋白溶液装满 0.5ml 的 eppendorf 管，进行封闭，4℃ 过夜。在此管中加入 50 μ l 的 20 μ g/ μ l 的实施例 5 制得的带环氧功能基磁性微球悬液，再加入 200 μ l 的 1.2mg/ml 羊抗人免疫球蛋白 IgG 碳酸钠缓冲液(pH9.6)，在 37℃ 温育摇床下反应 2 小时，然后用磁性分离架将磁球固定，将上清液除去，用磷酸盐洗涤液（PBS-T, 含 0.05% Tween20）洗涤磁球，每次洗涤 5 分钟，洗涤三次。再用 1% 牛血清白蛋白溶液对磁球表面进行封闭，37℃ 温育摇床下反应 1 小时，此步骤对消除抗原在磁球表面的非特异性吸附是很有必要的。将 200 μ l 的待测抗原人免疫球蛋白 IgG 溶液加入封闭完的 eppendorf 管中，37℃ 温育摇床下反应 1 小时。用 PBS-T 洗涤三次，每次 5 分钟。将 200 μ l 荧光素 FITC 标记的兔抗人免疫球蛋白 IgG

加入反应的 200 μl eppendorf 管, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 小时后, 用 PBS-T 洗涤二次, 再用去离子水洗涤一次, 用 50 μl PBS 溶液稀释磁球。

检测使用 Scanner Array 4000 玻璃片荧光扫描系统。首先清洗玻璃片, 将玻璃片 (25mm \times 75mm) 在铬酸洗液中浸泡 2 小时, 用大量去离子水冲洗后 N_2 吹干。接着将它们再依次放入正己烷、丙酮和无水乙醇中各超声 15 分钟后, 放在 80 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中烘 5 分钟后, 立即使用微机械手将反应得到的纳米磁球悬液在玻璃片点成阵列形状, 每个斑点大约皮升量级, 大小为 300 μm , 点与点之间的距离为 800 μm , 最后在氮气流下吹干。然后用 Scanner Array 4000 荧光成像。532nm 的 He-Ne 激光器为激发光源, Scanner Array 4000 扫描玻璃片得到的玻璃表面的荧光图像, 其荧光强度是经 Array 4000 软件处理过的, 是一个相对强度。

应用实施例 3

纳米磁性微球吸附 DNA 片段

本发明方法制备的纳米磁性微球可用于从各种生物样品中提取、分离与纯化 DNA, 改变分离体系的盐和有机溶剂的种类、浓度, pH 值, 可改变 DNA 从样品中的回收率。本例中方法步骤如下: 在高温消毒的 eppendorf 管中加入 15mg/ml 的纳米磁性微球(实施例 2 制得) 悬浮液 40 μl , 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的双链 λ -DNA marker(HindIII 单切) 15 μl , 在漩涡振荡器上轻微振荡 15s, 再加入 4 mol.L $^{-1}$ 的 NaI 溶液 80 μl , 轻微振荡 30s, 然后静置 3 分钟, 再加入 100 μl 异丙醇, 轻微振荡 5s, 然后静置 2 分钟, 用磁性分离架将磁球固定, 将上清液除去, 用 100 μl 异丙醇洗涤吸附 DNA 的纳米磁球 2 次, 加入 50 μl TE 溶液(pH8.0, 10 mmol.L $^{-1}$ Tris.Cl, 1mmol.L $^{-1}$ EDTA), 在水浴中 62 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 12 分钟将 DNA 从磁球上洗脱下来, 然后将磁球与 TE 溶液分离, 将得到的 TE 溶液用琼脂糖水平凝胶电泳检测分离的 DNA 片段, 试验指出, 在不

同盐溶液, 不同 pH 值环境中, 分子量差异较大的 DNA 片段回收率不同; 整个操作只需要 15min。不同条件下 DNA 提取液琼脂糖凝胶电泳图见图 4。

应用实施例 4

用纳米磁性微球分离大肠杆菌的基因组 DNA

样品为培养过夜的不含质粒的 Ecoli 菌株, 试验步骤为: 取收获的细胞培养液 1ml 离心 3000rpm×30s, 弃上清。再加入 500 μ l SDS 细胞裂解液, 摇匀、室温静置 10min; 然后加入 50 μ l 实施例 1 制得的纳米磁性微球, 同时加入 300 μ l 丙酮; 在漩涡振荡器上轻微振荡 30s, 室温静置 5min; 用磁性分离架将磁球固定, 弃上清后, 再用 70% 乙醇洗磁性微球 2 次。然后加 100 μ l TE 溶液(pH8.0), 水浴恒温 65 $^{\circ}$ C, 10min。再用磁性分离架将磁球固定, 收集洗脱液, 进行紫外分析和琼脂糖凝胶电泳。用不同方法、不同纳米磁性微球分离大肠杆菌基因组 DNA 提取液琼脂糖凝胶电泳图见图 5。采用紫外分光光度计测量提取的大肠杆菌基因组 DNA 的 A 值, 提取液在稀释 50 倍后 260nm 和 280nm 的比值都在 1.8 以上。DNA 产量约为 30 μ lg/ml, 与传统的 SDS 加蛋白酶 K 破胞, 酚-氯仿抽提法相比, 产量及纯度相当。本方法的优点在于:①本方法简便、快速, 仅需 20min 即可完成操作。②本法易于实现自动化操作。③在一支 eppendorf 管中即可完成操作, 不需离心。④在室温条件下本操作在任何一步停顿下来, 在 24 小时内可以接着继续操作, 无需重新开始。

说明书附图

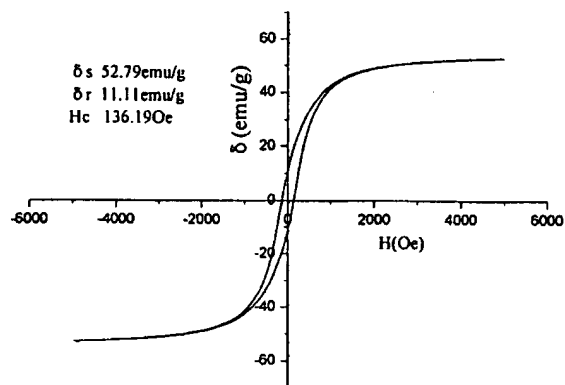


图 1

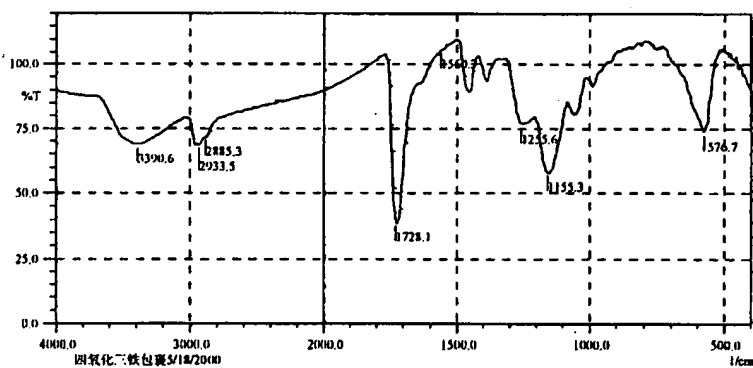


图 2

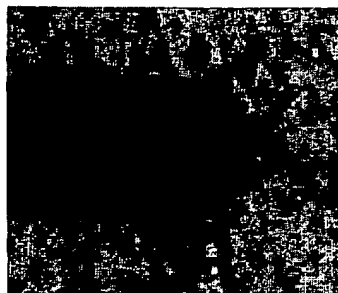


图 3

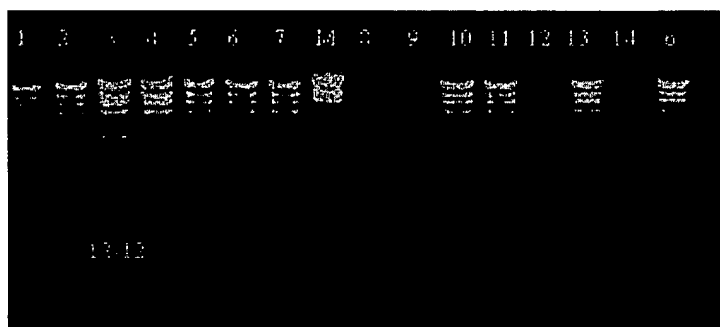


图 4

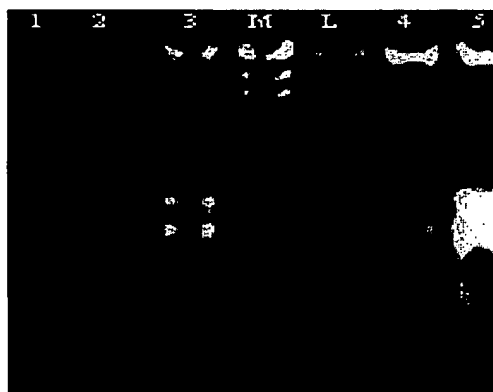


图 5